Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 29, No.1, Spring 2019 ORIGINAL ARTICLE

Evaluating the presentation of *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$, and *bla*$_{SHV}$ resistance genes in *Escherichia coli* isolated from animal food sources in Tonekabon city and determination of their antibiotic resistance profile

Shiva Khajavi[1], Zoheir Heshmatipour[2], Akram Sadat Tabatabaee Bafroee[3]
[1] MSc, Department of microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
[2]Assistant professor, Department of microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
[3]Assistant professor, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: prevalence of *E. coli* which produces broad spectrum Beta-lactamases in the category of animals like sheep as well as the risk of its transmission to humans have become a significant concern during recent years. The purpose of the research was to study the presence of genes *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{TEM}$ and *bla*$_{SHV}$ in *E.coli* isolates derived from lamb meat in butcheries of Tonekabon city, and to determine the anti-biotic resistance pattern of these isolates.
Materials and methods: 50 samples of lamb meat were randomly collected from butcheries of Tonekabon city and were transferred to laboratory under sterile conditions. The presence of studied genes was examined using PCR technique and proprietary primers. Anti-biotic sensitivity test was conducted using Kirby's disk diffusion method.
Results: Among obtained isolates, 30 isolates were identified as *E. coli*. All 30 isolated (100%) carried the *bla*$_{CTX-M}$ gene and lacked *bla*$_{SHV}$. *bla*$_{CTX-M}$ was identified in 7 isolates (23.3%). 7 samples (23.3%) were positive for both *bla*$_{CTX-M}$ and *bla*$_{TFM}$. The analysis of anti-biotic resistance showed that the isolates were resistant against amoxicillin-clavulanic (86/7%), doxycycline and cephadol (10%) and tetracycline (6/7%). On the other hand, all 30 isolates (100%) were susceptible to cefotaxime and ceftazidime, and 28 isolates were susceptible to ceftriaxone.
Conclusion: Isolates susceptible to antibiotics which carrying resistant genes, probably have the potential to become resistant against them. Thus logical usage of antibiotics should be considered more than before.
Keywords: *E.coli, blaCTX-M, bla TEM, bla SHV, Animal food sources.*

Cited as: Khajavi SH, Heshmatipour Z, Tabatabaee Bafroee AS. Evaluating the presentation of *bla*$_{CTX-M}$ ،*bla*$_{TEM}$ and *bla*$_{SHV}$ resistance genes in *Escherichia coli* isolated from animal food source in Tonekabon and determination of their antibiotic resistance profile. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(1): **56-63.**

Correspondence to: Zoheir Heshmatipour
Tel: *+98 9112911915*
E-mail: zheshmat@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7364-0119
Received: 20 May 2018; **Accepted:** 3 Sep 2018

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۹، شماره ۱، بهار ۹۸، صفحات ۵۶ تا ۶۳

Original Article

بررسی حضور ژن‌های مقاومت bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} در *اشرشیاکلی* های جداشده از منابع غذایی حیوانی در شهر تنکابن و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها

شیوا خواجوی[۱]، زهیر حشمتی پور[۲]، اکرم سادات طباطبایی بفرویی[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *: شیوع اشرشیا کلی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف طی سال‌های اخیر در دسته حیواناتی چون گوسفند و خطر انتقال آنها به انسان به مشکلی بزرگ تبدیل شده است. هدف این تحقیق بررسی وجود ژن‌های bla_{TEM} ,bla_{CTX-M} و bla_{SHV} در ایزوله‌های اشرشیا کلی به دست امده از گوشت‌های گوسفندی قصابی‌های تنکابن و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها بود.*

روش بررسی: *در این تحقیق، ۵۰ نمونه گوشت گوسفندی به روش تصادفی جمع آوری شدند و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. وجود ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. تست حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن کربی بایر انجام شد.*

یافته‌ها: *۳۰ ایزوله به عنوان اشرشیا کلی شناسایی شدند. تمامی ۳۰ (۱۰۰ ٪) ایزوله حامل ژن bla_{CTX-M} و فاقد ژن bla_{SHV} بودند. ژن bla_{TEM} در ۲۳/۳(۷ ٪) ایزوله شناسایی شد. ۷ نمونه (۲۳/۳٪) برای هر دو ژن bla_{CTX-M} و bla_{TEM} مثبت بودند. آنالیز مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که ایزوله‌ها مقاومت چشمگیری نسبت به آموکسیلین-کلاولانیک (۸۶/۷ ٪)، دزوکسی سیلین و سفاماندول (۱۰ ٪) و تتراسایکلین (۶/۷ ٪) دارند. از طرف دیگر، تمامی ۳۰ (۱۰۰ ٪) ایزوله به سفوتکسیم و سفتازیدیم و ۲۸ (۹۳/۳ ٪) ایزوله به سفتریاکسون حساسیت نشان دادند.*

نتیجه‌گیری: *ایزوله‌های حساس به آنتی‌بیوتیک‌ها که حامل ژن‌های مقاومت به آنها هستند احتمالا پتانسیل تبدیل به حالت مقاوم را دارند. بنابراین مصرف منطقی آنتی‌بیوتیک‌ها باید بیش از قبل درنظر گرفته شود.*

واژگان کلیدی: *اشرشیا کلی ، blaCTX-M, bla TEM, bla SHV. منبع غذای حیوانی.*

مقدمه

امروزه با افزایش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در میان باکتری‌های بیماری‌زا، درمان این دسته از بیماری‌های عفونی را با مشکلات فراوانی مواجه کرده است. از زمان‌های قبل، آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام از معمول‌ترین درمان‌های عفونت‌های میکروبی محسوب می‌شدند (۱). آنزیم‌های بتالاکتاماز مهم‌ترین عامل مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام در میان باکتری‌های گرم منفی، به خصوص باکتری های خانواده *انتروباکتریاسه* هستند (۲). در سال‌های اخیر، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBL) در میان باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های با منشا دامی شیوع فراوانی یافته

آدرس نویسنده مسئول: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن ، گروه میکروبیولوژی ، زهیر حشمتی پور (**email**: : zheshmat@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0002-7364-0119
تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۲/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۶/۱۲

است و این موضوع از لحاظ بهداشت عمومی حائز اهمیت است (۳). اگر چه باکتری‌های مقاوم ابتدا در نمونه‌های انسانی مشاهده شدند، اما شواهد نشان دهنده افزایش پیدایش سویه‌های تولید کننده ESBLs توسط *اشرشیا کلی* در حیواناتی چون خوک‌ها، اسب‌ها، گربه‌ها، جوجه‌های گوشتی، سگ‌ها، گله‌های گاو و گوسفند است (۴). مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام در دام‌ها و طیور سبب افزایش شیوع سویه‌های باکتریایی مقاوم شده است، به طوری که باکتری‌های مقاوم به وفور از طریق مدفوع دفع شده و با آلوده کردن آب، محصولات گیاهی، گوشت و فرآورده‌های لبنی به انسان منتقل شده و سبب بروز مقاومت و کاهش اثر بخشی آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های انسان می‌شوند. این پراکندگی و پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک معضل بزرگی برای سلامت عمومی است که می‌تواند به مصرف کنندگان این گوشت‌ها نیز انتقال یابد (۵). در حال حاضر، ابداع و کاربرد روش‌های اختصاصی برای شناسایی ESBLها به دلیل ضعف در درمان با سفالوسپورین‌های نسل سوم به طور جدی دنبال می‌شود. ESBLsها در تقسیم بندی که توسط Bush، Jacoby و Medeiros بر اساس پروفایل سوبسترا، ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک صورت گرفته است، به چهار گروه اصلی تقسیم بندی می‌شوند. ESBLsهای گروه A مهم‌ترین طبقه بندی بتالاکتاماز وسیع الطیف هستند که این گروه شامل بتالاکتامازهایی است که فقط در باسیل های گرم منفی شرح داده شده‌اند و سبب هیدرولیز پنی سیلین و سفالوسپورین‌های با طیف اثر اندک و وسیع می‌شوند (۶). بیشتر سویه‌های تولید کننده این گروه شامل موتانت‌های TEM-1، TEM-2 و SHV-1 هستند. امروزه بیش از ۹۰ تیپ TEM و بیش از ۲۵ تیپ SHV شناسایی شده است. تیپ‌های TEM و SHV معمولاً اغلب در میان *اشرشیا کلی* و *کلبسیلا پنمونیه* و کمتر در میان *پروتئوس* و *پرووِیدنسیا* یافت می‌شوند. برخلاف تیپ‌های TEM و SHV، بتالاکتامازهای CTX اثر تخریبی بیشتری بر آنتی بیوتیک‌های سفوتاکسیم و سفتریاکسون نسبت به سفتازیدیم دارند (۹-۷). برای کنترل انتشار بیشتر مقاومت‌ها در دام‌ها توسط سویه‌های انتروباکتریاسه و درمان سریع و مناسب عفونت‌هایی که مشکوک به ارگانیسم‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف هستند و همچنین جهت کسب آگاهی بیشتر از میزان شیوع ژن‌های مختلف این آنزیمرها در هر منطقه باید بررسی‌های مولکولی صورت گیرد. به همین منظور در مطالعه حاضر وجود ژن‌های TEM، SHV و CTX-M در ایزوله‌های *اشرشیا کلی* جدا شده از منابع غذایی دام شهرستان تنکابن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه

در این تحقیق تعداد ۵۰ نمونه گوشت گوسفندی به صورت چرخ کرده، لخم و جگر از قصابی های شهر تنکابن جمع آوری شد. نمونه‌ها تحت شرایط استریل و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد تنکابن منتقل شدند.

جداسازی و شناسایی اشرشیاکلی

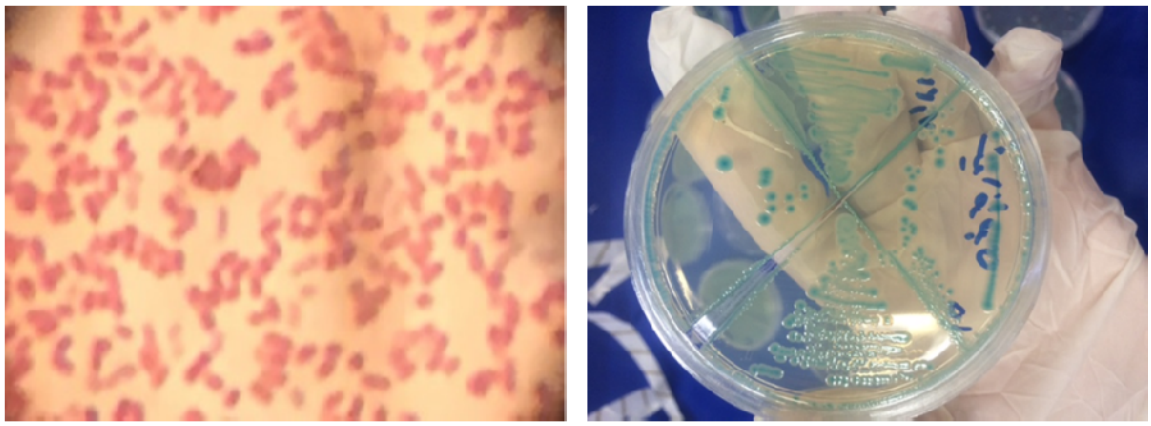
جهت غنی سازی باکتری *اشرشیا کلی*، ۵ گرم از هر نمونه بلافاصله پس از ورود به آزمایشگاه به طور مجزا در محیط غنی کننده EC براث (مرک، آلمان) تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شد. از کشت‌های غنی شده، رقت‌های سریال تهیه شد و به منظور شناسایی اولیه *اشرشیا کلی* از هر رقت روی محیط کروم آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس با استفاده از تکنیک‌های استاندارد و متداول میکروبیولوژی مانند بررسی مورفولوژی کلونی‌ها، رنگ امیزی گرم و تسترهای بیوشیمیایی (تست احیای نیترات، تست اکسیداز، تست تخمیر قند، تست مصرف سیترات، تست تولید H2S، تست اوره آز، تست Voges-Proskauer،تست Methyl Red،تست فنیل آلانین دآمیناز، تست لیزین دکربوکسیلاز) ایزوله‌های *اشرشیا کلی* شناسایی شدند.

بررسی حضور ژن‌های مقاومت bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} در *اشرشیا کلی*‌های جداشده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

DNA ژنومی از کلونی خالص کشت شبانه ایزوله های *اشرشیا کلی* روی محیط لوریا برتونی (مرک، آلمان) با استفاده از کیت استخراج DNA آنالیتیک (Analytikjena Co.)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. سپس غلظت DNA ژنومی به کمک اسپکتروفتومتر Thermo scientific Nano (drop, USA) در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. ایزوله‌های *اشرشیا کلی* بدست امده در این تحقیق از نظر وجود ژن های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن های موردنظر مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). واکنش PCR برای تشخیص ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که هر واکنش شامل ۱۲ میکرولیتر مستر میکس، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای ژن مربوطه، یک میکرولیتر از DNA

جدول۱- پرایمرهای اختصاصی ژن های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV}

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی پرایمر (5' to 3')	سایز قطعات DNA (bp)	منابع
blaCTX-M	F- ATGTGCAGYACCAGTAARGT R-TGGGTRAARTARGTSACCAGT	590 bp	(۱۸, ۱۹)
bla TEM	F- TCAACATTTCCGTGTCG R- CTGACAGTTACCAATGCTTA	1074 bp	۲۰
bla SHV	F- ATG CGT TAT WTT CGC CTG TGT R- TTA GCG TTG CCA GTG CTC G	1007 bp	۲۱



شکل۱- A: مورفولوژی کلونی *اشرشیا کلی* روی محیط کشت کروموژنیک B : تصویر میکروسکوپی *اشرشیا کلی* با بزرگنمایی x۱۰۰

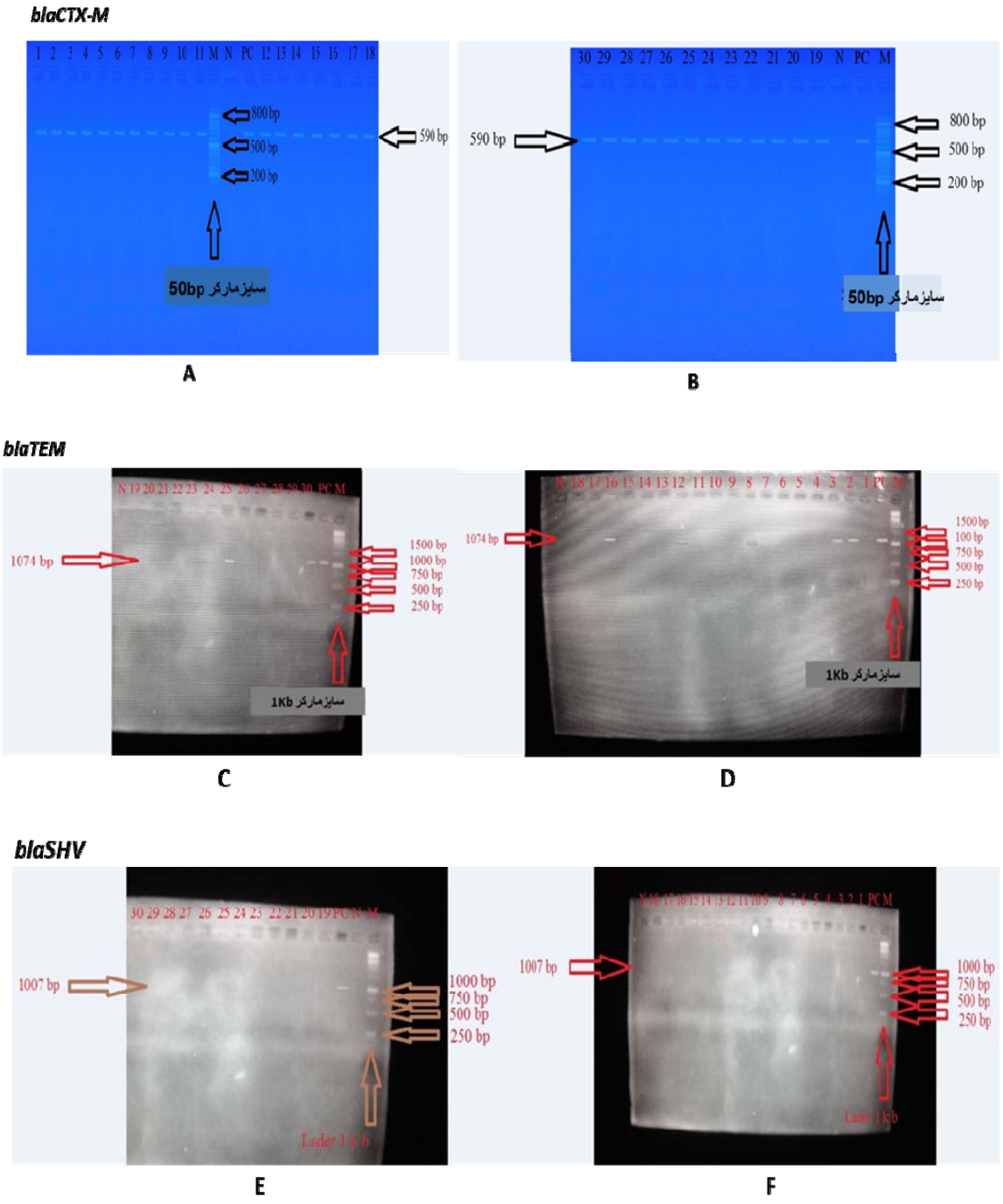
ژنومی و ۱۰ میکرولیتر آب دیونیزه بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی ژن‌های بتالاکتامازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، واسرشت شدن دو رشته در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ژن bla_{CTX-M}، ۵۸/۵ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} به مدت ۱ دقیقه و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. محصولات PCR با استفاده از تکنیک الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲٪ در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲ ساعت از یکدیگر مجزا شدند. سپس قطعات DNA بعد از رنگ امیزی با ایتیدیوم بروماید تحت تابش امواج اولتراویوله رویت شدند. همچنین از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 واجد ژن‌های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} به عنوان کنترل مثبت و از *اشرشیا کلی* ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی فاقد ژنهای موردنظر در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های *اشرشیاکلی*

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *اشرشیا کلی* با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی بائر) بر اساس پروتکل سازمان استانداردهای بالینی و ازمایشگاهی (CLSI۲۰۱۷) تعیین شد (۱۰). دیسک‌های آنتی بیوتیکی (شرکت پادتن طب ایران) مورد استفاده شامل آزترونام (AZT_{30})، سفوتاکسیم (CTX_{30})، آموکسی سیلین- کلاولانیک اسید (AMC_{10})، جنتامایسین (GM_{10})، تتراسایکلین (TE_{30})، داکسی سایکلین (D_{30})، سفتریکسون (CFX_{30}) سیپروفلوکساسین (CP_5)، نیتروفورانتوئین (FM_{300})، سفاماندول (CM_{30})، ارتاپنم (ETP_{10})، پیپراسیلین (PIP_{100})، تازوباکتام (PTZ_{10})، سفازولین (CZ_{30}) و سفتازیدیم (CAZ_{30}) بودند (۱۰). همچنین از سویه *اشرشیا کلی* ATCC 25922 به عنوان سویه کنترل استفاده شد. در این روش سوسپانسیون باکتریایی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند از هر ایزوله تهیه شد و روی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شدند. کشت‌ها پس از دیسک گذاری به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در دمای ۱±۳۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. قطر هاله‌های عدم رشد (mm) تعیین شد و نتایج به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم تفسیر شد.

یافته‌ها

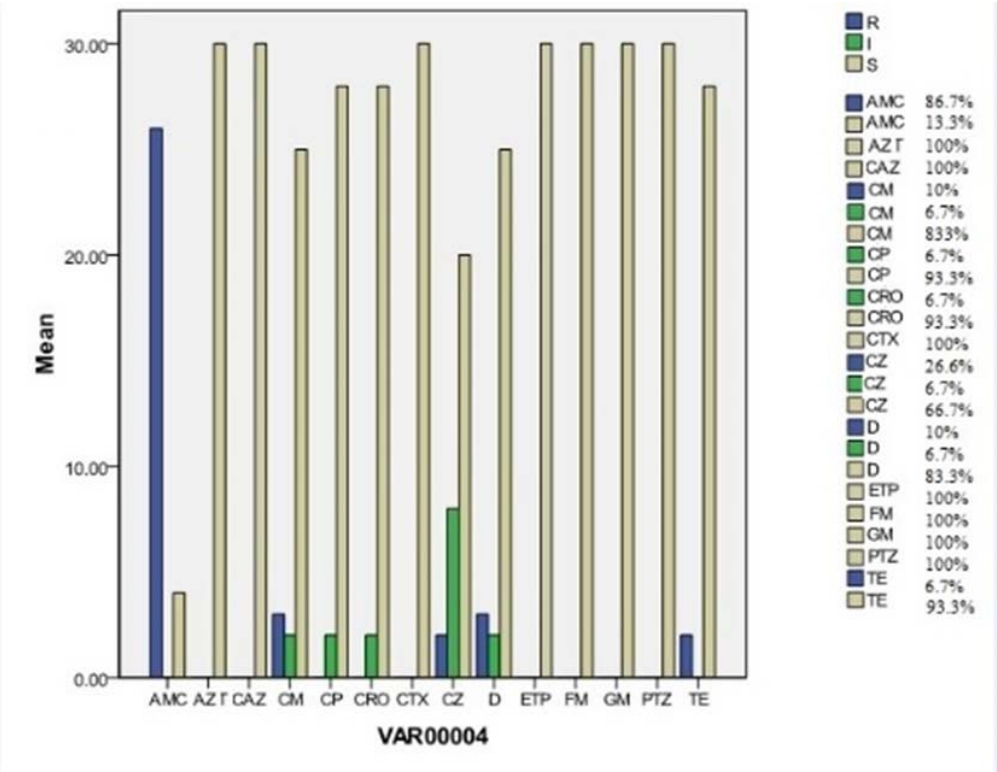
در این تحقیق از مجموع ایزوله های جداشده از ۵۰ نمونه گوشت گوسفند جمع آوری شده از قصابی‌های شهر تنکابن، ۳۰ ایزوله به عنوان *اشرشیا کلی* شناسایی شدند (شکل ۱).



شکل ۲ (A-F) - شناسایی ژنهای bla_{CTX-M} (۵۹۰ bp)، bla_{TEM} (۱۰۷۴ bp) و bla_{SHV} (۱۰۰۷ bp) در ایزوله های *اشرشیا کلی* (۳۰-۱) توسط تکنیک PCR . M: سایز مارکر (DNA ladder)، N: کنترل منفی (*اشرشیا کلی* ATCC25922) و PC: کنترل مثبت (*کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت بررسی حضور ژن‌های مقاومت bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} در *اشرشیا کلی*‌های جداشده

ایزوله‌های *اشرشیا کلی* از نظر وجود ژن های bla_{CTX-M}، bla_{TEM} و bla_{SHV} با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج ژنوتایپینگ به دست آمده از واکنش PCR که در شکل‌های ۲،



نمودار ۱. نمودار ستونی نمونه ها بر اساس نوع مقاومت آنتی بیوتیک ها. سطح افقی نمودار: نام آنتی بیوتیک، سطح عمودی نمودار: درصد ایزوله های *اشرشیا کلی* مقاوم و حساس به هر انتی بیوتیک، R(رنگ آبی): مقاوم، I (رنگ سبز): نیمه حساس، S (رنگ خاکستری): حساس

۳ و ۴ نشان داده شده‌اند، تمامی ایزوله‌ها (۱۰۰٪) دارای ژن bla_{CTX-M}، و ۷ (۲۳/۳٪) ایزوله دربرگیرنده ژن bla_{TEM} بودند، در عوض هیچ یک از ایزوله‌ها واجد ژن bla_{SHV} نبودند. از طرف دیگر ۲۳/۳٪ ایزوله‌ها در برگیرنده هر دو ژن مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف bla_{CTX-M} و bla_{TEM} بودند.

الگوی حساسیت و مقاومت انتی بیوتیکی

نتایج حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های به دست امده، بر اساس تعیین قطر هاله عدم رشد مطابق پروتکل استاندارد CLSI(۲۰۱۷) نشان داد، تمامی ۳۰ ایزوله *اشرشیا کلی* حساس به آنتی‌بیوتیک‌های آزترونام، سفوتاکسیم، ارتاپنم، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، پیپراسیلین، تازوباکتام و سفتازیدیم بودند. در حالی که، ۲۶ ایزوله به آموکسیلین_کلاولانیک اسید، ۳ ایزوله به داکسی سیلین، ۲ ایزوله به تتراسایکلین، ۳ ایزوله به سفاماندول و ۲ ایزوله به سفازولین مقاومت نشان دادند (نمودار ۱).

بحث

مقاومت آنتی بیوتیکی، سالانه هزینه‌های گزافی به سیستم‌های بهداشتی کشور تحمیل می‌کند. از طرفی، مطالعات فراوانی مشخص کرده‌اند که ژن‌های مقاومت از طریق زنجیره غذایی یا به صورت تماس مستقیم با انسان و حیوانات منتشر می‌شوند. اطلاعات درباره باکتری‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در غذاهایی که از حیوانات در ایران تهیه می‌شوند بسیار محدود است (۴، ۱۱). بنابراین بررسی وجود اشرشیا کلی تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف در منابع غذایی حیوانی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها به عنوان هدف عالی این پژوهش درنظر گرفته شد.

در این مطالعه، ۳۰ ایزوله اشرشیا کلی به دست آمده از ۵۰ نمونه گوشت گوسفندی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی ژنوتیپی ایزوله‌ها از نظر وجود ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف مورد نظر نشان داد که ژن bla_{CTX-M} در تمامی ایزوله‌ها و ژن bla_{TEM} تنها در ۷ ایزوله وجود داشت ولی ژن SHV blaدر هیچ یک از ایزوله‌ها شناسایی نشد. در تحقیقی که توسط پترنل و همکارانش در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت، در

۲۰ نمونه از مجموع ۱۰۰ نمونه گوشت چرخ کرده، تعداد ۲۴ سویه اشرشیا کولای جدا سازی شد که بیشتر این سویه‌ها حامل ژن bla_{CTX-M} بودند (۱۲). آگرس و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در استرالیا، میزان حضور ژن bla_{CTX-M}را در بین گوشت‌های خوک، ۶۶٪ گزارش کردند و در گوشت ماکیان وارداتی بیشترین میزان، مربوط به ژن‌های blaCMY-2 (۴۸٪)، bla_{CTX-M} (۲۵٪) وblaSHV (۱۶٪) بود (۱۳). نتایج تست آنتی بیوگرام صورت گرفته در این مطالعه نشان داد که میزان مقاومت علیه آموکسی سیلین -کلاولانیک اسید ۸۶/۷٪، داکسی سایکلین ۱۰٪، تتراسایکلین ۶/۷٪، سفاماندول ۱۰٪ و سفازولین ۶/۷٪ بود. ولی ۱۰۰٪ ایزوله ها نسبت به آنتی بیوتیک های آزترونام، سفوتاکسیم، ارتاپنم، جنتامایسین، نیتروفورانتوئین، پیپراسیلین، تازوباکتام و سفتازیدیم حساسیت نشان دادند. مطالعات مختلف در این رابطه نیز نتایج متفاوتی را ارائه دادند (۱۷-۱۴). دلایل تفاوت نتایج الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی و حضور ژن‌های بتالاکتامازی در مطالعات مختلف این است که نوع و میزان مصرف آنتی بیوتیک‌ها در مناطق مختلف متفاوت است و نوع جهشی که باعث مقاومت در این ژن‌ها می‌شود بر حسب مناطق جغرافیایی می‌تواند متفاوت باشد.

در مطالعه حاضر، ایزوله‌های به دست امده با وجود حساسیت نسبت به سومین نسل سفالوسپورین‌ها (سفوتاکسیم، سفتازیدیم)، دربرگیرنده ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (bla TEM،bla_{CTX-M}) بودند. این رخداد نشان می‌دهد که باکتری‌ها می‌توانند مخازنی از ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک باشند که ما نسبت به انها اگاه نیستیم و از طریق روش‌های فنوتیپی نیز قابل تشخیص نیستند. یزدی و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که تعدادی از ایزوله‌های اشرشیاکلی اوروپاتوژنیک حساس به سفالوسپورین-های نسل سوم، حامل ژن‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف (bla SHV، bla TEM) هستند (۱۸). روجو فرناندو جوز مارتینز نیز در سال ۲۰۱۱ خاموشی بالقوه ژن‌های مقاومت blaOXA-2 و tetA روی پلاسمید pVE46 ایزوله‌های اشرشیا کولای به دست امده از گوشت خوک را گزارش دادند که با وجود دارا بودن پلاسمید حامل این ژن‌های مقاومت هیچ تظاهر فنوتیپی نشان ندادند (۱۹). دکتر الکس اونیل عضو مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه لیدز انگلستان، این پدیده که برخی باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌هایی حساسیت نشان می‌دهند، ولی حامل ژن‌های مقاومت به آن آنتی‌بیوتیک‌ها هستند را "خاموش شدن مقاومت آنتی بیوتیکی توسط جهش "silencing of antibiotic resistance by mutation' (SARM) " نامید (۲۰). رخدادی که نگرانی قابل توجهی را به همراه دارد؛ زیرا، این دسته از باکتری‌ها این پتانسیل را دارند که به سرعت از حالت حساس به مقاوم تبدیل شوند (۲۱). بنابراین در ارتباط با این مسئله باید مطالعات بیشتر و عمیق‌تری صورت گیرد که لازمه آن جمع‌آوری نمونه‌های مختلف با منشا حیوانی به صورت دوره‌ای از مناطق جغرافیایی متفاوت و بررسی الگوی مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها نسبت آنتی بیوتیک‌های رایج از نظر ژنوتیپی و فنوتیپی است. با وجود اینکه ایزوله‌های به دست امده از نظر فنوتیپی قادر به تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف نبودند، اما به دلیل اینکه حامل ژن‌های مقاومت به بتالاکتامهای وسیع الطیف هستند و امکان انتقال این ژن‌ها بین سایر سویه‌ها و گونه‌های باکتریایی در جامعه وجود دارد، به عنوان زنگ خطر جدی برای بروز مقاومت‌های وسیع و چندگانه و انتشار آنها بین انسان و حیوان محسوب می‌شوند. لذا آزمون حساسیت ضد میکروبی باید برای هر دامداری مستقلاً پیش از تجویز آنتی باکتریال‌ها انجام شود.

REFERENCES

1. Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environ Pollut 2009;157:2893-902.

2. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev 2010;74:417-33.

3. Sallem RB, Slama KB, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, et al. Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31:1511-6.

4. Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Vet Res 2012;8:1.

5. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clin Microbiol Infect 2012;18:646-55.

6. Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, et al. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. Emerg Infect Dis 2005;11:54-61.

7. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi J Biol Sci 2015;22:90-101.

8. Livermore D. Defining an extended-spectrum β-lactamase. Clin Microbiol Infect 2008;14:3-10.

9. Bush K. Extended-spectrum β-lactamases in North America, 1987-2006. Clin Microbiol Infect 2008;14:134-43.

10. Melvin P. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. 2017.

11. Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum β-lactamase producers. Clin Microbiol Infect 2008;14:117-23.

12. Petternel CH, Galler H, Zarfel G, Luxner J, Haas D, Grisold A. Isolation bacteria from minced meat in Asteria. 2014.

13. Agersø Y, Aarestrup FM, Pedersen K, Seyfarth AM, Struve T, Hasman H. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing Escherichia coli in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. J Antimicrob Chemother 2012;67:582-8.

14. Bonyadian M, Ebrahimi A, Jamali M. Study on the antibiotic resistance of E.coli isolated from raw milk and unpasteurized cheese and survey on resistance transmission to E.coli O2:K12. J Vet Clin Sci 2013;7:25-31.

15. Haghighi KP, Ali Nezhad I. Antibacterial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from broilers coli bacillosis of broilers chicks in golestan province. J Vet Clin Res 2010;1:39-47.

16. Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R. Prevalence of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli on Bavarian dairy and beef cattle farms. Appl Environ Microbiol 2013;7:3027-32.

17. Kala A, Kahler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Balau V, et al. High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase producing Entrobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. J Antimicrob Chemother 2012;67:2631-4.

18.Yazdi M, Nazemi A, Mirinargasi M, Jafarpour M, Sharifi SH .Genotypic versus Phenotypic methods to detect Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in Uropathogenic Escherichia coli. Annals Biol Res 2012;3:2454-8.

19. Martınez JL, Rojo F. Metabolic regulation ofantibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 2011;35:768-89.

20. O'Neil AJ. 'Silent' antibiotic resistance genes: an overlooked issue of considerable importance in antibacterial chemotherapy, 2017.

21. Enne VI, A. Delsol A, M. Roe J, M. Bennett P. Evidence of Antibiotic Resistance Gene Silencing in E*scherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 2006;50:3003-10.